



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107290521 A

(43)申请公布日 2017.10.24

(21)申请号 201710429246.4

(22)申请日 2017.06.08

(71)申请人 北京大学人民医院

地址 100044 北京市西城区西直门南大街
11号

(72)发明人 王殊 郭嘉嘉 杨后圃 张刘璐

(74)专利代理机构 北京孚睿湾知识产权代理事
务所(普通合伙) 11474

代理人 刘翠芹

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

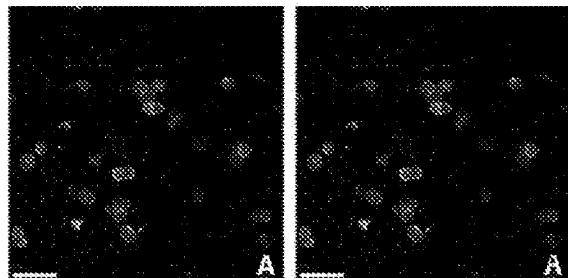
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54)发明名称

Anti-EpCAM在乳腺癌腋窝淋巴结转移诊断
试剂中的应用及其检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种乳腺癌腋窝淋巴结转移的
诊断,具体涉及Anti-EpCAM在乳腺癌腋窝淋巴结
转移诊断试剂中的应用。本发明中使用荧光染料
Cy7标记的EpCAM单克隆抗体anti-EpCAM/Cy7在
体外细胞实验中显示了其肿瘤细胞靶向显影的
敏感性,可实现乳腺癌腋窝淋巴结转移的无创检
测,具有临床应用价值。



1. 一种抗上皮细胞粘附分子抗体(anti-EpCAM)在制备检测乳腺癌腋窝淋巴结转移的诊断试剂或试剂盒中的应用,其特征在于,所述抗上皮细胞粘附分子抗体(anti-EpCAM)通过荧光染料进行标记,所述荧光染料的荧光素选自Cy系列荧光染料、异硫氰酸荧光素、四甲基异硫氰酸罗丹明、TRITC、2乙基罗丹明中的一种。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述Cy系列荧光染料为Cy7荧光染料。

3. 根据权利2所述的应用,其特征在于,所述乳腺癌选自上皮细胞粘附分子表达阳性,在淋巴结中上皮细胞粘附分子表达阴性或极弱表达乳腺癌。

4. 一种利用荧光染料标记的抗上皮细胞粘附分子抗体anti-EpCAM进行乳腺癌淋巴结转移快速免疫组化的检测方法,其特征在于,将目标淋巴结与抗上皮细胞粘附分子抗体anti-EpCAM进行免疫组化染色,继而通过判断淋巴结显影情况确认是否存在乳腺癌淋巴结转移。

5. 根据权利要求4所述的检测方法,其特征在于,所述荧光染料标记的抗上皮细胞粘附分子抗体anti-EpCAM为Cy7荧光染料标记的anti-EpCAM(anti-EpCAM/Cy7)。

Anti-EpCAM在乳腺癌腋窝淋巴结转移诊断试剂中的应用及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种乳腺癌淋巴结转移检测,尤其是涉及Anti-EpCAM在乳腺癌腋窝淋巴结转移检测试剂及试剂盒方面的应用,属于生物检测试剂领域。

背景技术

[0002] 乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,在欧美及我国许多大中城市都占女性恶性肿瘤发病率的首位。腋窝淋巴结转移情况是乳腺癌重要的预后因素之一,同时在很大程度上决定着乳腺癌辅助治疗的决策。目前临幊上对于淋巴结转移状态的评估均需要有创手术或操作来进行的,包括腋窝淋巴结清扫和腋窝前哨淋巴结活检等。对于淋巴结没有转移的早期乳腺癌患者,这些有创评估方式会带来上肢水肿、功能障碍等诸多并发症,发生率在20%-30%之间。随着社会对乳腺癌的重视以及乳腺癌筛查的推广,早期乳腺癌诊断比例越来越高。如果能在术前进行无创的腋窝淋巴结肿瘤转移情况评估,可以使腋窝阴性的患者避免行腋窝手术,大大降低术后并发症的发生。但是目前临幊上的各无创的项影像学检查都是以形态学改变为诊断依据的,因此都不能够精确、准确的判断淋巴结内是否存在少量肿瘤细胞。因此这些无创检查都不能作为乳腺癌淋巴结评估的标准。

发明内容

[0003] 针对上述问题,本发明的目的在于提供了一种能够快速准确检测乳腺癌淋巴结转移情况的诊断试剂。

[0004] 在众多的肿瘤特异性表达抗原中,本发明人筛选得到一种抗原EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule,上皮细胞粘附分子)。EpCAM是一种跨膜糖蛋白,也是肿瘤干细胞的重要标志物,在多种上皮恶性肿瘤中高表达,通过上调c-myc、cyclin A/E等基因的表达,直接刺激细胞,促进细胞增殖。在生理情况下,EpCAM不同程度低表达除鳞状上皮细胞之外所有的正常上皮细胞中,且多位于细胞间紧密连接处,在结缔组织及造血系统来源的细胞、脑组织和血管内皮细胞中缺乏明显的EpCAM的表达。病例情况下,EpCAM几乎表达于所有的腺癌中,包括结直肠腺癌、胃腺癌、乳腺癌、卵巢癌、肺腺癌、前列腺癌、胰腺癌以及肝细胞癌和视网膜母细胞瘤。

[0005] 本发明人意外地发现,用可以在体外检测的信号(近红外荧光)对anti-EpCAM进行标记,利用抗原抗体反应实现标记物与肿瘤的特异性结合,可以实现对乳腺癌腋窝淋巴结转移的快速检测。

[0006] 因此,本发明的再一目的在于提供抗上皮细胞粘附分子抗体(anti-EpCAM)在用于制备检测乳腺癌腋窝淋巴结转移的诊断试剂或试剂盒中的应用。

[0007] 在用本发明所述anti-EpCAM进行乳腺癌腋窝淋巴结转移情况进行检测时,优选的是,将所述anti-EpCAM预先通过荧光染料进行标记,所用的荧光染料可以是选自Cy系列荧光染料、异硫氰酸荧光素、四甲基异硫氰酸罗丹明、TRITC及2乙基罗丹明,优选Cy系列荧光

染料如Cy7荧光染料,如Cy7标记的EpCAM单克隆抗体(anti-EpCAM/Cy7)。

[0008] 进行乳腺癌腋窝淋巴结转移进行检测时,所述的乳腺癌类型优选的是乳腺癌选自上皮细胞粘附分子表达阳性,但在淋巴结中上皮细胞粘附分子表达阴性的乳腺癌。

[0009] 在进行乳腺癌腋窝淋巴结转移情况进行检测时,可以是对乳腺癌患者上切除的淋巴结进行检测,也可以将本发明将本发明所述标记的anti-EpCAM注射在肿瘤患者附近的乳腺间质内,通过肿瘤周围的淋巴组织引流至腋窝淋巴结,依据淋巴结内残留荧光显影判断淋巴结肿瘤转移情况,通过肿瘤靶向显像,实现淋巴结肿瘤转移情况的无创评估。

[0010] 在本发明的一个实施方案中,利用VX2细胞进行体外实验,证实anti-EpCAM/Cy7与肿瘤细胞的特异性结合。

[0011] 在本发明的再一实施例中,通过动物实验中排除了anti-EpCAM/Cy7非特异性结合,在健康新西兰兔中注射anti-EpCAM/Cy7,30小时候淋巴结中未见荧光显影,荧光消失。

[0012] 本发明在动物实验中证实了anti-EpCAM/Cy7能够与腋窝淋巴结内的肿瘤细胞特异性结合,在动物模型上实现腋窝淋巴结肿瘤转移情况的无创评估。具体步骤如下:使用VX2细胞接种于新西兰白兔乳房内,饲养4周后建立乳腺癌淋巴结转移动物模型。以VX2模型兔为实验组,正常新西兰兔为对照组,应用anti-EpCAM/Cy7作为靶向成像探针检测腋窝淋巴结转移,并与病理结果进行对照。结果表明体外荧光成像无创评估淋巴结转移的敏感性为100% (13/13),假阴性率0% (0/13);特异性为90.0% (9/10),假阳性率为10.0% (1/10)。证实利用荧光标记肿瘤特异性抗体可用于乳腺癌腋窝淋巴结转移状态的无创检测。

附图说明

[0013] 图1为本发明anti-EpCAM/Cy7在体外与肿瘤细胞及淋巴组织显影图,其中A为VX2肿瘤细胞显影,B为淋巴结组织不显影。

[0014] 图2为本发明anti-EpCAM/Cy7在健康及荷瘤兔上的腋窝淋巴结显影情况,其中IS表示注射部位,A-C依此为正常新西兰兔2、24、30小时后的淋巴结显影,D-F依此为荷瘤模型兔2、24、30小时后的淋巴结显影;

具体实施方式

[0015] 材料:荧光标记肿瘤特异性抗体anti-EpCAM/Cy7:10 μ moI/L购自上海瑞齐生物制剂有限公司;

[0016] VX2荷瘤兔购自武汉科技大学介入实验室;

[0017] 新西兰白兔:购自北京永欣康泰科技发展有限公司。

[0018] 实施例1anti-EpCAM/Cy7与肿瘤细胞的特异性结合体外实验

[0019] 实验组VX2细胞进行anti-EpCAM预处理,对照组淋巴组织进行IgG预处理,彻底洗脱后加入anti-EpCAM/Cy7进行细胞荧光免疫实验。图1结果证实anti-EpCAM/Cy7能够与VX2肿瘤细胞特异性结合,而正常淋巴结组织没有非特异性结合。

[0020] 实施例2乳腺癌腋窝淋巴结转移检测

[0021] 乳腺癌淋巴结转移动物模型的建立:无菌切除VX2荷瘤兔后腿肿瘤,剔除肿瘤包膜并切细块,组织块在无菌不锈钢网上研磨和过筛,收集组织悬液,无菌生理盐水冲洗三遍,5mL注射器抽取备用。将组织悬液注射于试验用12只实验组新西兰白兔胸前第二对乳垫,每

个注射部位0.5mI。种植后检测肿瘤生长,4周后全部种植瘤成活,平均直径1.5cm。

[0022] 腋窝淋巴结体外荧光成像:将10 μ moI/L、0.1mIanti-EpCAM/Cy7分别皮内注射至12只荷瘤模型兔及12只对照正常新西兰兔第二对乳房,局部按摩。关闭手术灯,使用体外荧光成像仪进行近红外荧光成像,连续观察至注射后30小时并记录腋窝淋巴结显影情况。图2结果表明,正常新西兰兔的淋巴结荧光显影在24h后变得极为微弱,30小时候基本消失,而荷瘤模型兔30h后仍然显示清晰的荧光显影。

[0023] 病理检查:将全部淋巴结体外荧光显影情况进行记录,然后逐一切除分别标记后送病理检查。

[0024] 结果:实验组12只模型兔24侧腋窝淋巴结,23侧成功显影,1侧显影失败,显影成功率为95.8% (23/24)。实验组显影成功的23侧腋窝淋巴结,其中13侧淋巴结荧光检测为阳性,9侧淋巴结荧光检测为阴性,与病理检测结果一致。一侧淋巴结荧光检测为阳性,病理检测为阴性,为假阳性结果。荧光单抗用于检测腋窝淋巴结转移状态的病理符合率为95.6% (22/23)。

[0025]

病理结果	对照组 (N=24)		实验组 (N=24)	
	荧光显影 (+)	荧光显影 (-)	荧光显影 (+)	荧光显影 (-)
	(+)	(-)	(+)	(-)
病理结果	0	0	13	0
(+)				
病理结果	0	24	1	9
(-)				

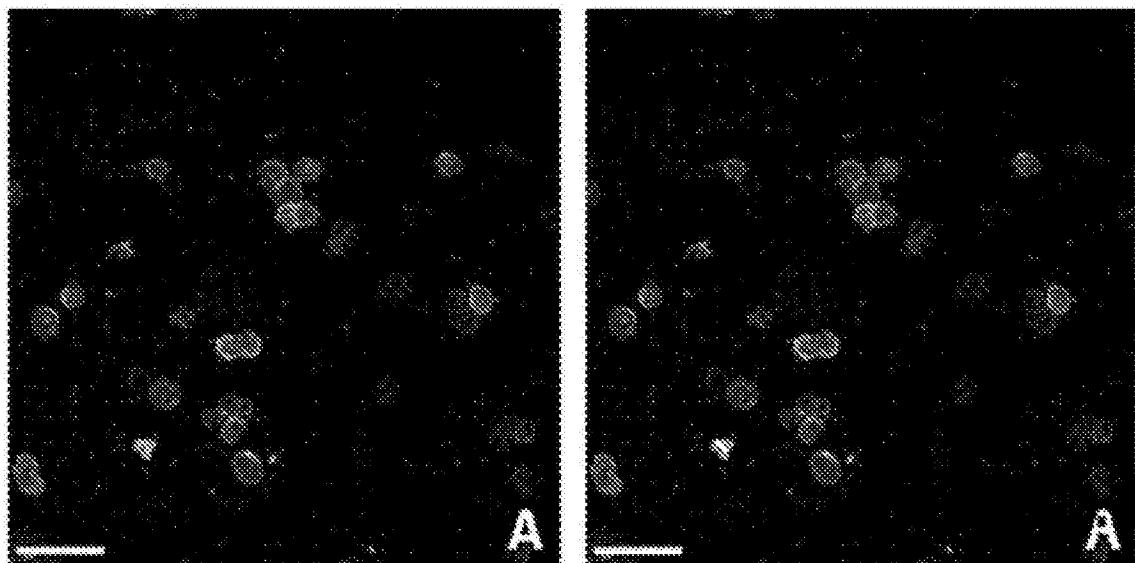


图1

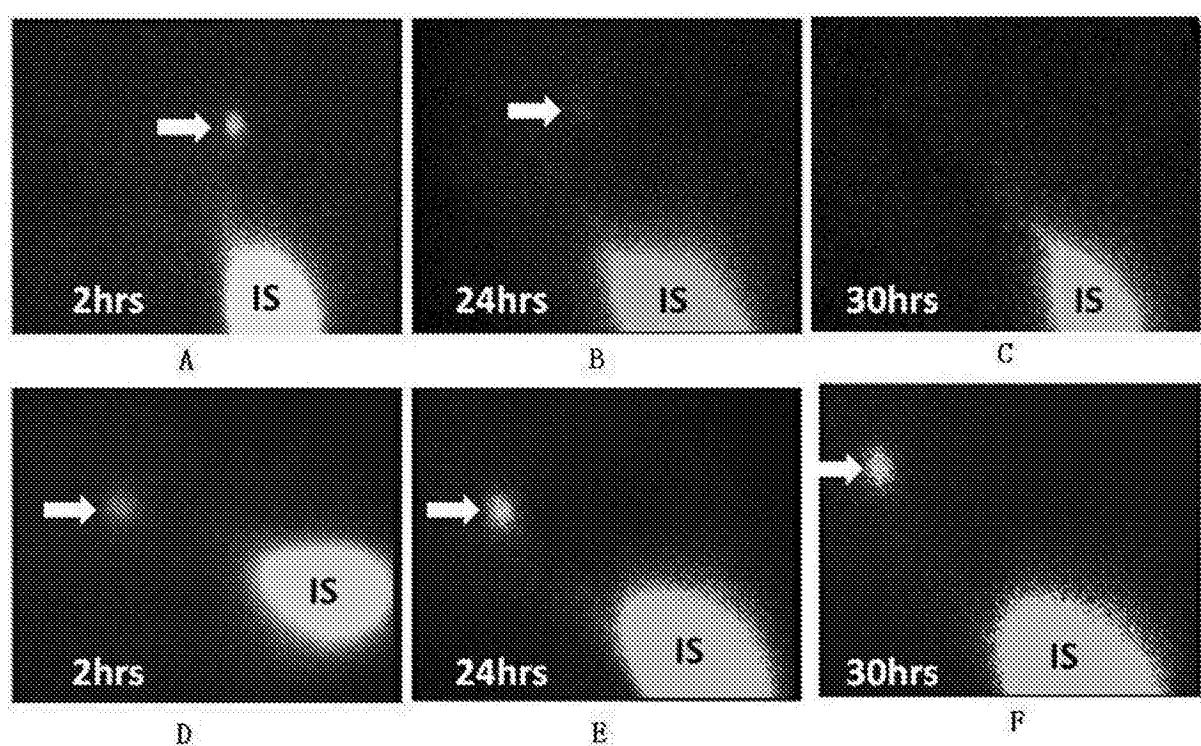


图2

专利名称(译)	Anti-EpCAM在乳腺癌腋窝淋巴结转移诊断试剂中的应用及其检测方法		
公开(公告)号	CN107290521A	公开(公告)日	2017-10-24
申请号	CN201710429246.4	申请日	2017-06-08
[标]申请(专利权)人(译)	北京大学人民医院		
申请(专利权)人(译)	北京大学人民医院		
当前申请(专利权)人(译)	北京大学人民医院		
[标]发明人	王殊 郭嘉嘉 杨后圆 张刘璐		
发明人	王殊 郭嘉嘉 杨后圆 张刘璐		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/57415		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明涉及一种乳腺癌腋窝淋巴结转移的诊断，具体涉及Anti-EpCAM在乳腺癌腋窝淋巴结转移诊断试剂中的应用。本发明中使用荧光染料Cy7标记的EpCAM单克隆抗体anti-EpCAM/Cy7在体外细胞实验中显示了其肿瘤细胞靶向显影的敏感性，可实现乳腺癌腋窝淋巴结转移的无创检测，具有临床应用价值。

